



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LAS HORMONAS SEXUALES EN EL TONO BASAL DEL
MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS DE COBAYO**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

BERENICE RUBIO TORRES



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

AÑO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Atonatiu Edmundo Gómez Martínez**

VOCAL: **Profesor: José Fausto Rivero Cruz**

SECRETARIO: **Profesor: Luis Manuel Montaña Ramírez**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Oscar Armando Pérez Méndez**

2° SUPLENTE: **Profesor: Luz María del Rocío Valdés Gómez**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN ASMA, TORRE DE INVESTIGACIÓN,
EN LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM**

ASESOR DEL TEMA:

Dr. LUIS MANUEL MONTAÑO RAMÍREZ

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. EDGAR FLORES SOTO

SUSTENTANTE (S):

BERENICE RUBIO TORRES

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue financiada por DGAPA proyecto PAPIIT No. IN201216.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	6
Lista de figuras y tablas	10
Resumen	11
Introducción	13
Generalidades de las hormonas sexuales	13
La dehidroepiandrosterona	14
La testosterona	15
El 17 β -estradiol	15
Biosíntesis de las hormonas sexuales	16
Niveles fisiológicos de dehidroepiandrosterona	18
Niveles fisiológicos de testosterona	19
Niveles fisiológicos de 17 β -estradiol	20
Principales mecanismos de acción de las hormonas sexuales	21
Mecanismo genómico	21
Mecanismo no genómico	21
Las hormonas sexuales y su efecto sobre las vías aéreas	22
Principales mecanismos que mantienen el tono basal	25
ATPasa de Ca ²⁺ del retículo sarcoplásmico	26
ATPasa de la membrana plasmática	26
Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺	27
Planteamiento del problema	28
Hipótesis	28
Objetivos	28
General	28
Particulares	28
Metodología	29
Fármacos	30
Análisis estadístico	31
Resultados	32
Discusión	39
Conclusión	42
Perspectivas	42
Bibliografía	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
Ach	Acetilcolina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
C	Carbono
Ca ²⁺	Ion Calcio
[Ca ²⁺] _i	Concentración de ion calcio intracelular
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
Cch	Carbacol
CO ₂	Dióxido de carbono
DE	Desviación estándar
DEM	Desviación estándar de la media
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHEA-S	Metabolito sulfatado de la dehidroepiandrosterona
EE	Error estándar
Er α	Receptor a estrógeno α
Er β	Receptor a estrógeno β
ESM	Error estándar de la media
E ₂	17 β -estradiol

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
GMP _c	Guanosín monofosfato cíclico
H ⁺	Ion Hidrógeno
IgE	Inmunoglobulina E
IL-10	Interleucina 10
IL-β	Interleucina β
K ⁺	Ion Potasio
KCl	Cloruro de Potasio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio monobásico
MgSO ₄	Sulfato de magnesio
MLVA	Músculo liso de las vías aéreas
mM	Milimolar
Na ⁺	Ion Sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NADPH ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NCX	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺
NCX _{REV}	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ en su fase reversa
NO	Óxido nítrico

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
nM	Nanomolar
μ M	Micromolar
O ₂	Oxígeno molecular
OH ⁻	Ion hidroxilo
OVA	Ovoalbúmina
Pg	Picogramo
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PMCA	ATPasa de Ca ²⁺ de la membrana plasmática
PR-A	Receptor a progestina A
PR-B	Receptor a progestina B
RA	Receptor a andrógenos
RE	Retículo Endoplásmico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RS	Retículo Sarcoplásmico
SERCA	ATPasa de Ca ²⁺ del retículo sarcoplásmico
SOC	Canales de calcio operados por depósito
TES	Testosterona

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
VDCC	Canales de calcio dependientes de voltaje
VDCC-L	Canales de calcio dependientes de voltaje tipo L
3 β -HSD	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
5-HT	5-hidroxitriptamina (receptor de serotonina)
17 β -HSD	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
μ M	Micromolar

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Estructuras químicas de TES, DHEA y 17 β estradiol	13
2	Biosíntesis de las hormonas sexuales	17
3	Niveles fisiológicos de DHEA (nmol/L) en función de la edad	18
4	Esquema que muestra las tres proteínas principales responsables de mantener el tono basal	25
5	La DHEA produce disminución del tono basal en el MLVA de cobayo.	32
6	Efecto de la TES en el tono basal del MLVA de cobayo.	33
7	El 17 β estradiol no produce disminución significativa del tono basal del MLVA de cobayo.	34
8	El efecto del salbutamol en el tono basal del MLVA de cobayo es similar al efecto producido por DHEA y TES.	36
9	Comparación de los porcentajes de relajación de DHEA, TES, 17 β - estradiol, y salbutamol.	37
TABLA 1	Niveles en plasma de TES (ng/dL) en hombres y mujeres en función de la edad	19
TABLA 2	Niveles fisiológicos de estradiol (E ₂) en plasma en las diferentes fases del ciclo menstrual de la mujer promedio	20
TABLA 3	Promedio de los porcentajes de relajación de DHEA, 17 β - estradiol, TES y salbutamol	38

RESUMEN

La dehidroepiandrosterona (DHEA) es una hormona sexual endógena que es secretada a través de las glándulas suprarrenales en la zona reticular a partir del colesterol. La DHEA es precursora de otras hormonas sexuales masculinas y femeninas (andrógenos y estrógenos), como lo son la testosterona y el 17 β -estradiol.

La DHEA o su metabolito sulfatado DHEA-S, constituyen el producto de secreción esteroideo más elevado de la glándula adrenal. La concentración plasmática de DHEA-S es de 300-500 veces más alta que la propia concentración de DHEA y ésta a su vez, presenta una concentración de 10 a 20 veces más alta que cualquier otro esteroide hormonal. Los niveles de esta hormona en el cuerpo alcanzan su nivel máximo en plasma en la segunda década de la vida y comienzan a declinar después de los 30 años, de manera progresiva, hasta alcanzar los niveles más bajos a partir de la quinta década de la vida. La declinación de la secreción de la DHEA, y de la DHEA-S, coincide con el aumento de la incidencia de varias enfermedades degenerativas de tipo: cardiovascular, metabólicas, cognitivas o motoras; por lo que desde hace décadas se ha considerado a la DHEA como responsable, en parte, de mantener la salud general del organismo (Traish *et al.*, 2011; Saltzman y Guay, 2006; Rainey *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que la DHEA muestra un efecto broncodilatador en el músculo liso de las vías aéreas (MLVA) de cobayos sensibilizados cuando el tejido es precontracturado con diferentes agonistas. Además, se ha propuesto que la DHEA es capaz de producir relajación del músculo liso uterino y vascular vía un efecto no genómico (Espinoza J *et al.*, 2013).

En el laboratorio de investigación en asma, se observó que la hormona testosterona (TES) además de relajar el MLVA al ser precontracturado con diferentes agonistas, también disminuía el tono basal, que es el equilibrio entre la contracción y la relajación de éste tejido. Teniendo esto como antecedente y el efecto de la DHEA sobre el MLVA, el objetivo principal del presente trabajo de investigación fue el de evaluar el efecto de DHEA, TES y 17 β -estradiol sobre el

tono basal usando como sustancia de referencia el salbutamol, debido a su conocido efecto relajante en el MLVA.

Para ello, se utilizó la técnica de órganos aislados donde se obtuvieron registros isométricos y se obtuvo el porcentaje de relajación sobre el tono basal inducido por cada hormona y por el salbutamol. La DHEA y la TES mostraron un porcentaje de relajación similar al del salbutamol mientras que con el 17β -estradiol no se observó este efecto relajante. Sin embargo, con el salbutamol se manejaron concentraciones nanomolares mientras que con la DHEA y la TES fueron del orden micromolar, por lo que se concluye que la DHEA y la TES tienen un efecto relajante sobre el tono basal del MLVA de cobayo y en comparación con el salbutamol este efecto es menos potente pero igual de eficaz.

INTRODUCCIÓN

Generalidades de las hormonas sexuales

Las hormonas esteroideas o sexuales son lípidos derivados del colesterol, que comparten la misma estructura química de 4 anillos de carbono fusionados, llamada ciclopentanoperhidrofenantreno y se diferencian y clasifican por el número de carbonos y por los grupos funcionales que presentan. Las progestinas, glucocorticoides y mineralocorticoides poseen 21 carbonos; los andrógenos tienen 19 átomos de carbono y los estrógenos tienen 18 carbonos (Voet *et al.*, 2007).

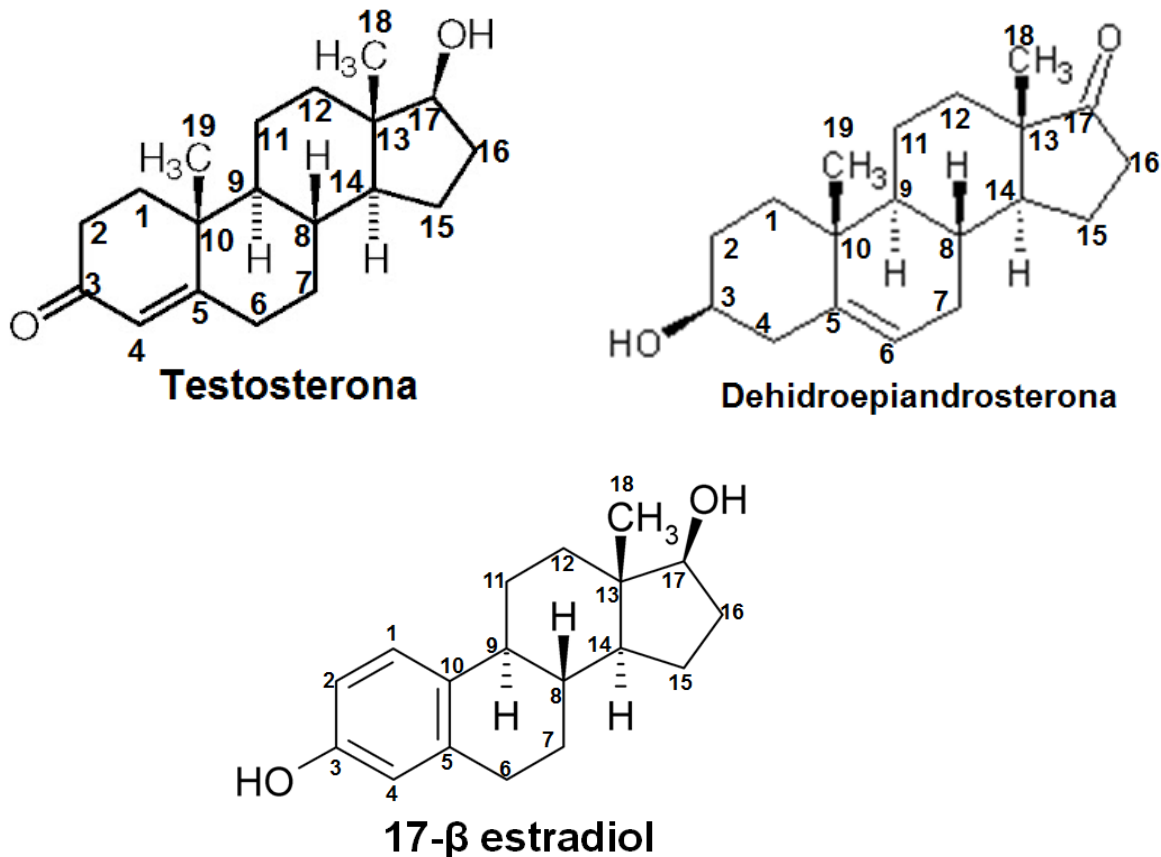


Figura 1. Estructuras químicas de la testosterona (TES, andrógeno), dehidroepiandrosterona (DHEA) y 17β-estradiol (estrógeno) en la que se observa la diferencia del número de carbonos entre cada una y los grupos funcionales característicos de cada una (Voet *et al.*, 2007).

Las hormonas esteroideas, cuando se sintetizan presentan aspectos comunes que posteriormente se diversifican según el tejido y los mecanismos responsables para producir andrógenos y estrógenos. Las gónadas masculinas y femeninas producen las hormonas esteroideas sexuales (estrógenos, progesterona y andrógenos). En mujeres embarazadas la placenta es también una fuente de hormonas esteroideas, entre las más importantes se encuentran la progesterona y el 17β -estradiol.

Las hormonas esteroides sexuales son las encargadas de mantener los fenotipos sexuales: masculino (andrógenos) y femenino (estrógenos y progesterona); y son peculiarmente importantes en los procesos reproductivos.

La dehidroepiandrosterona

La dehidroepiandrosterona (DHEA) es una hormona esteroidea que se produce en la zona reticular de las glándulas suprarrenales y en las gónadas. Es la precursora de todas las hormonas esteroides corporales naturales (andrógenos y estrógenos) (Romieu P *et al.*, 2003).

Y junto con su éster sulfatado, el sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S) constituyen el producto de secreción esteroidea más elevado de las glándulas suprarrenales (Baulieu EE *et al.*, 2000).

En la actualidad el papel fisiológico de la DHEA y DHEA-S no se ha esclarecido totalmente. De acuerdo a Ebeling y Koivisto, la DHEA tiene un papel tanto estrogénico como androgénico, y la diferencia de sus efectos dependerá de la concentración hormonal del medio en el que se encuentre (Ebeling y Koivisto., 1994).

Como se observa en la figura 1 la estructura química de la DHEA tiene 19 átomos de carbono, un doble enlace entre el C5 y C6, un átomo de oxígeno en C17 y un sustituyente hidroxilo (OH^-) en C3.

La testosterona

La testosterona (TES) es una hormona sexual del grupo de los andrógenos, es producida principalmente en los testículos de los hombres y en los ovarios de las mujeres, aunque en menor cantidad que en los hombres, es secretada en pequeñas cantidades por las glándulas suprarrenales y es la hormona sexual principal masculina.

Sus efectos fisiológicos principales son: (a) *anabólicos*, que incluyen el crecimiento de la masa muscular e incremento de la densidad ósea, (b) *androgénicos*, que incluyen la maduración de los órganos sexuales (Voet *et al.*, 2007).

En cuanto a su estructura química como se muestra en la figura 1, tiene 19 átomos de carbono, un doble enlace entre C4 y C5, un átomo de oxígeno en C3 y un sustituyente hidroxilo (OH) en C12 (Amado y Florez., 2003).

El 17 β -estradiol

El 17 β -estradiol (E₂) es una hormona sexual femenina derivada del colesterol, es el estrógeno predominante durante los años reproductivos de la mujer, también se encuentra presente en el hombre, pero en niveles más bajos que la mujer. Es producido principalmente en las células granulosas de los ovarios, pero también se produce en el cerebro y las paredes arteriales (Voet *et al.*, 2007).

El E₂ actúa en el desarrollo, mantenimiento y función de los órganos reproductores femeninos y masculinos, ciclos de actividad sexual y características sexuales secundarias femeninas (Valsecia., 2012).

Sus principales funciones metabólicas son: retención de agua y sal, regulación de metabolismos proteico/cálcico y lipídico, ayuda a la coagulación sanguínea por el incremento en la producción de factores de coagulación (Amado y Flores., 2003). Cuando se libera en las células se une con su receptor celular y entra al núcleo de las células para ejercer su efecto (Voet *et al.*, 2007).

El E₂ contiene 18 átomos de carbono, un grupo hidroxilo en el C3 y C17 y a diferencia de la DHEA o la TES posee un anillo aromático (Figura 1).

Biosíntesis de las hormonas sexuales

Primeramente, para que se de origen a las hormonas sexuales ocurre la bioconversión del colesterol a la pregnenolona, mediante una hidrólisis de la cadena lateral del colesterol, por la acción de la enzima p450scc (*side chain cleavage*). La pregnenolona tiene dos vías de biotransformación: (1) es metabolizada por la enzima P450 C-17 para que se forme la dehidroepiandrosterona (DHEA), y (2) es sustrato de la enzima 3 β -HSD (HSD: hidroxisteroide deshidrogenasa) que origina a la progesterona, la cual es metabolizada por la enzima P450 C-17 y que se forme la androstenodiona, la cual es un precursor de la testosterona (TES). La DHEA puede ser sulfatada para producir su metabolito, sulfato de DHEA (DHEA-S); también puede ser biotransformada a androstenodiol, por una reducción del grupo 17-ceto, mediante la acción de la enzima 17 β -HSD y androstenodiona, por acción de la 3 β -HSD que oxida el grupo 3 β -hidroxilo. Las enzimas 3 β -HSD y la 17 β -HSD toman como sustratos al androstenodiol y a la androstenodiona para biotransformarse a TES (Pozzi *et al.*, 2003; Poletti *et al.*, 1998).

La enzima P450 aromatasa toma como sustrato a la TES, que reduce su grupo 3-ceto y aromatiza el anillo A con pérdida del C19, para generar, el E₂ (Amado y Flores.,2003).

Las células que secretan hormonas sexuales tienen cantidades muy grandes de retículo endoplásmico liso, el orgánulo en el cual sintetizan estas sustancias. Las hormonas sexuales son lipófilas y difunden fácilmente a través de las membranas, tanto para salir de la célula que las produce como para entrar en la célula blanco. Cuando un estímulo activa a la célula que las produce, los precursores que están en el citoplasma se convierten rápidamente en la hormona activa. La

concentración de hormona en el citoplasma aumenta, y la molécula sale de la célula por difusión simple (Castillo S *et al.*, 2009).

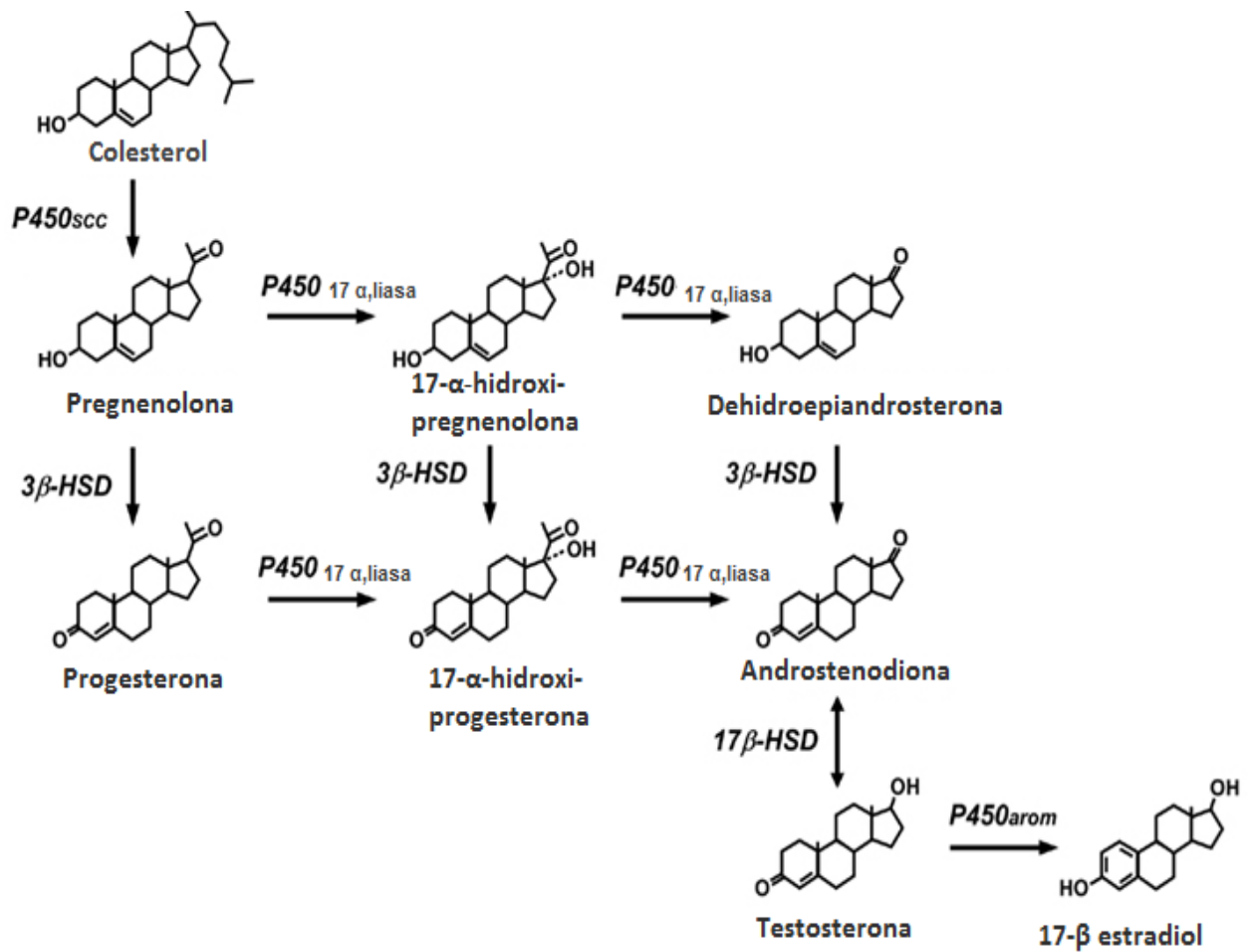


Figura 2. Biosíntesis de las hormonas sexuales (Tomada y editada de Tsutsui K., 2011).

Niveles fisiológicos de dehidroepiandrosterona

Los niveles fisiológicos en plasma de la DHEA son mayores que cualquier otra hormona sexual, de 20 a 30 veces mayor (Baulieu EE *et al.*, 2000), en un adulto promedio sus niveles son de 20-25 nmol/L alcanzando su nivel máximo en plasma entre los 20-30 años y de ahí en adelante comienzan a declinar de manera progresiva, hasta alcanzar los niveles más bajos en los últimos años de vida de cada persona. (Fig. 3; Labrie, 1998).

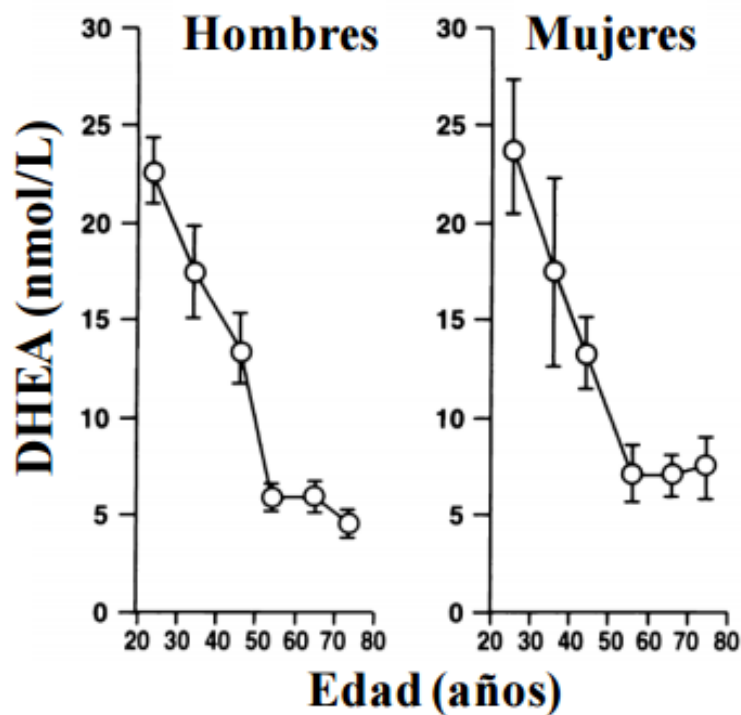


Figura 3. Niveles fisiológicos de DHEA (nmol/L) en función de la edad (Tomada y modificada de Labrie., 1998).

Existen varias enfermedades degenerativas que se relacionan con la disminución de la secreción de la DHEA y su metabolito sulfatado DHEA-S así como el aumento de la incidencia de dichas enfermedades, estas enfermedades son del tipo cardiovascular, cognitivas, metabólicas o motoras; debido a esto se ha considerado, desde hace más de una década que la DHEA está relacionada con la salud general del ser humano (Rainey WE *et al.*, 2002).

Niveles fisiológicos de testosterona

La concentración en sangre periférica de la TES, en un adulto sano se encuentran entre los 11-36 nmol/L (Perusquía M y Villalón CM., 2010; Orrego A *et al.*, 2004), sin embargo, de esta concentración sólo el 2% de la TES se encuentra en forma libre en la sangre (Ostatnikova D *et al.*, 2002) y el 98% se encuentra unida a proteínas de unión que se encargan del transporte de moléculas no-hidrosolubles, como la albumina y la globulina fijadora de hormonas sexuales, lo que impide que la TES ingrese al citoplasma de las células (Diver MJ *et al.*, 2002).

Tabla 1. Niveles en plasma de TES en hombres y mujeres en función de la edad (ng/dL) (Tomada y modificada de Ottinger MA., 1998).

Hombres		Mujeres	
Edad:	Niveles de TES (ng/dL):	Edad:	Niveles de TES (ng/dL):
0-5 meses	75-400	0-5 meses	20-80
6 meses-9 años	<7-20	6 meses-9 años	<7-20
10-11 años	<7-130	10-11 años	<7-44
12-13 años	<7-800	12-16 años	<7-75
14 años	<7-1,200	17-18 años	20-75
15-16 años	100-1,200	19+ años	ago-60
17-18 años	300-1,200		
19+ años	240-950		
Hombre adulto promedio	270-1,070	Mujer adulta promedio	15-70
30+ años	-1% por año		

Al igual que ocurre con la DHEA y su metabolito sulfatado DHEA-S, los niveles plasmáticos de la TES disminuyen de forma progresiva con la edad, como se observa en la figura 4, entre los 30 y 40 años de edad alcanza su nivel máximo (22-24 nmol/L) en hombres y después va disminuyendo hasta el fin de la vida (Salom MG y Martínez JM.,2010), en mujeres también ocurre esta disminución

progresiva conforme avanza la edad, sin embargo los niveles plasmáticos son menores ya que son otras hormonas como el 17- β estradiol, las que se encuentran en mayor cantidad y regulan las funciones hormonales de las mujeres (Reyna A *et al.*,2002).

Niveles fisiológicos de 17 β -estradiol

Los niveles del E₂ en plasma en la mujer promedio varían de acuerdo a la etapa de su ciclo menstrual en el que se encuentren. En la Tabla 1 se muestran estos valores.

Tabla 2. Niveles fisiológicos del E₂ en plasma en las diferentes fases del ciclo menstrual de la mujer promedio. (Borawski D, Bluth MH., 2011)

Fase del ciclo menstrual	Niveles de E ₂ (pg/mL)
Fase folicular	57-227 pg/mL
Fase preovulatoria	127-476 pg/mL
Fase leutinizante	77-227 pg/mL

Cuando existe período de embarazo los niveles del E₂ varían de acuerdo a la semana de embarazo en la que se encuentre la mujer, cuanto más cerca esté del parto, más alta será su concentración.

Al igual que ocurre con la DHEA y la TES los niveles del E₂ van disminuyendo progresivamente después de la tercera década de la vida y en el periodo de menopausia los niveles van de 19.7-8.0 pg/mL (Amado JA., 2013).

Se ha observado que la disminución de TES, DHEA y E₂ está asociada con una mayor incidencia de padecimientos relacionados con el género y se han asociado a patologías como las enfermedades metabólicas, endocrinas, disfunción eréctil, neurodegenerativas, cardiovasculares, respiratorias y de tipo alérgico (Traish *et al.*, 2009).

Principales mecanismos de acción de las hormonas sexuales.

Los mecanismos de señalización de las hormonas sexuales son dos; el mecanismo clásico o genómico, que involucra la modulación de la expresión de diversos genes y el mecanismo no genómico que es independiente de la modulación de genes y se distingue principalmente por la rapidez de sus efectos.

El **mecanismo genómico** es característico debido a que sus efectos se observan a largo plazo y son irreversibles. En este mecanismo, las hormonas esteroides sexuales son activadas al atravesar la membrana plasmática y unirse a su receptor citoplasmático específico (Prieto GA *et al.*, 2002). Los receptores intracelulares específicos para cada grupo de esteroides sexuales son: los receptores a estrógenos ($Er\alpha$ y $Er\beta$); los receptores a progestinas (PR-A PR-B) y el receptor a andrógenos (RA). Los principales receptores para hormonas sexuales se encuentran dentro de las células, ya sea en el citoplasma o en el núcleo. Los complejos formados por las hormonas esteroideas y sus receptores son transportados hacia el núcleo celular, donde actúan como factores de transcripción, uniéndose al ADN y activando o reprimiendo uno o más genes. Los genes activados generan nuevo RNAm (RNA mensajero) que dirige la síntesis de nuevas proteínas (Pennel TM y Morrow EH., 2013).

En el **mecanismo no genómico** de las hormonas esteroides sexuales, al contrario del mecanismo genómico los efectos ocurren rápidamente de segundos a minutos y sus efectos son reversibles debido a que no requiere de procesos de transcripción y síntesis de proteínas para producir el efecto deseado y no requiere de la unión de la hormona a su receptor intracelular específico (Falkenstein *et al.*, 2000; Wierman., 2007). Debido a esto el efecto debe ser mediado por los receptores, por la activación o bloqueos de canales, intercambiadores, etc. (Nemere y Farach C., 1998), como, por ejemplo, la regulación de los canales iónicos (de Na^+ , Ca^{2+} o K^+) de la membrana plasmática, las proteínas tirosina cinasa, el GMPc (Guanosín Monofosfato Cíclico) o el AMPc (Adenosin Monofosfato Cíclico) (Simoncini y Genazazani., 2003; Rahman y Christian., 2007).

Las hormonas sexuales y su efecto sobre las vías aéreas

Actualmente los efectos genómicos y no genómicos de las hormonas sexuales en las vías aéreas no se han esclarecido completamente (Revisado por Ortelt-Prigione., 2012; Verma *et al.*, 2011) ya que existen distintas opiniones con relación al comportamiento de las vías aéreas frente a la acción de las hormonas sexuales en las distintas etapas de la vida tanto en hombres como en mujeres.

Con respecto a la DHEA, se ha observado que esta hormona produce efectos antiinflamatorios en las vías aéreas, funcionando como un factor de transcripción (Karsperska-Zajac., 2010; Yu *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2002) el cual puede disminuir al factor de necrosis tumoral α (TNF α , citocina proinflamatoria) (Kimura *et al.*, 1998) e inhibir los niveles de la inmunoglobulina IgE, la cual está presente en cantidades elevadas en distintos procesos alérgicos. En pacientes con exacerbaciones frecuentes, los niveles de DHEA y DHEA-S se encuentran disminuidos, es por esta razón que se señala que los efectos antiinflamatorios de la DHEA podrían utilizarse en el tratamiento para prevenir el desarrollo del asma alérgica (Sudo *et al.*, 2001). Asimismo, se ha documentado que la restitución de los niveles fisiológicos de la DHEA causa mejorías en pacientes asmáticos (Choi *et al.*, 2008; Eusebio *et al.*, 2011). Recientemente se estudió la acción relajante de la DHEA en el MLVA de cobayos normales y sensibilizados, pre contraídos con Cloruro de Potasio (KCl), Carbacol (CCh) o Ovalbumina (OVA) a diferentes concentraciones, observándose un efecto relajante dependiente de la concentración (Espinoza J *et al.*, 2013).

Se ha reportado que la TES al igual que la DHEA, también induce efectos benéficos en los hombres asmáticos y otras enfermedades alérgicas y que la administración de esta provoca disminución de las respuestas inflamatorias (Olsen y Kovacs., 1995) y disminuye los síntomas de hombres asmáticos que padecen hipogonadismo. La TES también disminuye la IL- β y el TNF α , las cuales son citosinas proinflamatorias, e incrementa los niveles de la IL-10 (Corrales *et al.*, 2006; Malkin *et al.*, 2004).

Aunado a sus acciones (genómicas) antiinflamatorias, los andrógenos inducen efectos no genómicos sobre las vías aéreas. Es conocido que provocan relajación de diferentes tipos de músculo liso, como son el vascular y el uterino; se ha reportado que este efecto relajante es mediado por el bloqueo de los VDCC (canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje) (Perusquia *et al.*, 2005; Montaña *et al.*, 2008). En este contexto, las evidencias experimentales del efecto relajante de los andrógenos sobre el MLVA son escasas.

En un estudio realizado con anillos traqueales de conejo, se reportó que la TES relaja el MLVA contracturado con acetilcolina (10 μM) o CCh (10 μM), de manera dependiente de la concentración (Kouloumenta *et al.*, 2006). En dicho estudio se mostró que el efecto relajante de la TES es del tipo no genómico, independiente del receptor a andrógeno (RA) intracelular. Este trabajo fue la primera evidencia de tipo experimental que muestra que la TES posee un efecto relajador benéfico sobre las vías aéreas.

Posteriormente, se han realizado otros estudios en los cuales se observó que en el MLVA, la TES produce relajación mediante el bloqueo de los Canales de Ca^{2+} tipo L (Perusquia M., 2014). Actualmente existen variadas evidencias del efecto relajante de la TES en el MLVA. En el laboratorio de investigación en asma de la facultad de medicina, se observó en distintas ocasiones que el MLVA, después de haber sido contracturado y posteriormente haberle adicionado TES, no solo llegaba a su basal si no que relajaba más allá del tono basal, cabe mencionar que el tono basal es considerado el punto intermedio entre la contracción y la relajación del músculo liso traqueal, estas observaciones abrieron el panorama a realizar nuevos estudios con el tono basal, debido a que no existen experimentos realizados con hormonas sexuales y el tono basal del MLVA. Recientemente Flores Soto E y col., 2015. Encontraron que la TES induce relajación a concentraciones nanomolar mediante el bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo L y a concentraciones micromolar mediante el bloqueo de SOC (canales de Ca^{2+} operados por depósito) y de forma autocrina libera a una prostaglandina (PGE_2).

Con respecto a los estrógenos existe evidencia clínica en la que se ha observado que la exacerbación del asma es mayor cuando los niveles de los estrógenos son menores. En algunos estudios se ha observado que el E₂ produce distintos efectos proinflamatorios en las vías aéreas los cuales están relacionados con el asma y otros padecimientos alérgicos (Tam *et al.*, 2011; Komi y Lassila., 2000 y Hamelmann *et al.*, 1999), como son el incremento de numerosas moléculas y células proniflamatorias y la estimulación de la presentación de los antígenos (Murphy y Gibson., 2008; Melgert *et al.*, 2007; Coerteling y Trifillieff., 2004; Haggerty *et al.*, 2003; Seymour *et al.*, 2002 y Tam *et al.*, 2011). Estos efectos proinflamatorios son llevados a cabo mediante un mecanismo genómico y algunos autores los señalan como los responsables de la incidencia del asma en mujeres en edad reproductiva (Choi., 2011; Romieu *et al.*, 2010; Macsali *et al.*, 2009; Jarvis y Leynaert., 2008; Zaitso *et al.*, 2007; Salam *et al.*, 2006; Gillum., 2005; Barr y Camargo Jr., 2004; Fagan *et al.*, 2003; Lange *et al.*, 2001; Drimanov y Oppenheimer., 1998 y Troisi *et al.*, 1995;); contrario a esto existen otros estudios en los que se ha observado que los estrógenos tienen un efecto relajante no genómico del MLVA (Townsend *et al.*, 2010).

Recientemente se han realizado estudios *in vitro* en preparaciones bronquiales y traqueales de ratón, en donde se observa que el estradiol, a concentraciones fisiológicas (Tabla 1) previene la contracción inducida por carbacol (CCh) mediante un mecanismo no genómico (Dimitropulou *et al.*, 2005). En otros estudios también se ha demostrado que el estradiol induce diferentes efectos no genómicos como son, la síntesis del óxido nítrico (NO), el incremento de los niveles del GMPc y la disminución de la concentración del Ca²⁺ intracelular [Ca²⁺]; (Townsend *et al.*, 2012; Townsend *et al.*, 2010 y Pang *et al.*, 2002) lo que provoca una relajación del MLVA.

Actualmente se cuenta con poca información acerca del papel de las hormonas sexuales en la regulación del tono basal de las vías aéreas o de sus efectos en el MLVA. A continuación, describiré las principales proteínas involucradas en este mecanismo.

Principales mecanismos que mantienen el tono basal

Se conocen al menos tres proteínas transportadoras que de manera particular participan en el mantenimiento del tono en su estado basal: 1) La ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA, por sus siglas en inglés), la cual transporta Ca^{2+} del citoplasma hacia el medio extracelular. 2) La ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA, por sus siglas en inglés), que se encarga de transportar al Ca^{2+} del citoplasma al interior del retículo sarcoplásmico (RS). Ambas proteínas utilizan ATP como fuente de energía para transportar Ca^{2+} en contra del gradiente electroquímico y ambas bombas son ATPasas de tipo P, las cuales se caracterizan por presentar un intermediario fosforilado obligado en el ciclo de bombeo (Wray S., 2007 y Clapham., 1995). 3) El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en su fase normal (NCX), un cotransportador que trabaja a favor del gradiente electroquímico del Na^+ y cuya función principal es sacar 1 ion Ca^{2+} del citoplasma al espacio extracelular por cada 3 iones Na^+ que introduce al citoplasma provenientes del medio extracelular (DiPolo R y Beaugé L., 2006; Blaustein MP y Leader WJ., 1999).

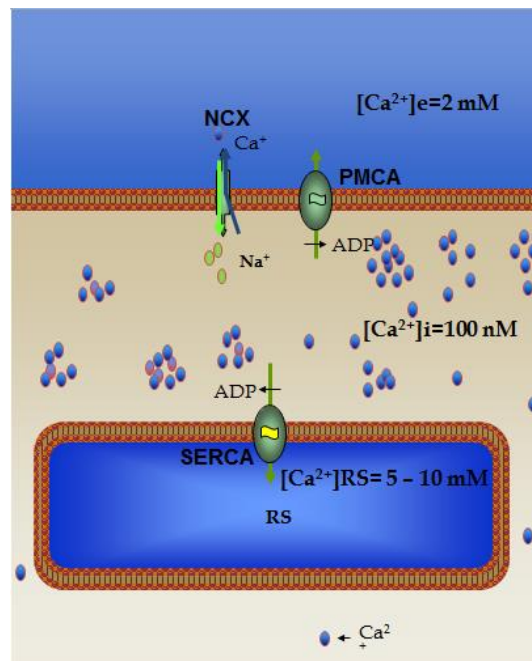


Figura 4. Esquema que muestra las tres proteínas principales responsables de mantener el tono basal que son, ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA), ATPasa de la membrana plasmática (PMCA), y NCX. (Creado en el laboratorio de asma).

ATPasa de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico

La familia de SERCA es el producto de al menos tres diferentes genes que generan un mínimo de 11 proteínas diferentes. La bomba SERCA pertenece a la familia de las ATPasas tipo P, que incluye a la PMCA, la ATPasa de Na⁺/Ca²⁺ y las ATPasa de H⁺ y de K⁺. Esta proteína tiene una masa molecular de 110 kDa y se localiza en la membrana del RS o del RE. La característica más notable de este tipo de bombas es que son capaces de transferir un fosfato terminal del ATP a un residuo de aspartato en el dominio catalítico, resultando en un cambio conformacional reversible. La bomba es reconocida como el principal sistema para el control del Ca²⁺ citoplásmico en células musculares y su habilidad para disminuir el Ca²⁺ del citosol, a la par de otros mecanismos celulares, induce relajación. Diversos estudios han demostrado que la bomba transporta dos iones Ca²⁺ por una molécula de ATP hidrolizada (Brini y Carafoli., 2009; Periasamy y Kalyanasundaram., 2007) y cotransporta un ión H⁺ en intercambio por Ca²⁺. Menos de 4 H⁺ se liberan al citoplasma por cada 2 iones de Ca²⁺ bombeados (Brini y Carafoli., 2009; Floyd R y Wray S, 2007).

ATPasa de la membrana plasmática

La bomba PMCA es el producto de cuatro diferentes genes expresadas de manera tejido-específico con muchas versiones alternativas (Clapham., 1995). En varios estudios se ha documentado un patrón de expresión de las PMCA's tejido y desarrollo específicos (Strehler y Zacharias., 2001).

Una característica importante de las bombas PMCA es que son autoinhibitorias, bajo condiciones normales el extremo COOH terminal de la bomba se dobla sobre sí mismo para interactuar con dos sitios en la primera y segunda asa sistólica de la enzima obstruyendo el sitio activo y, cuando las concentraciones de [Ca²⁺]_i se ven incrementadas, el complejo Ca²⁺-calmodulina se une a estas bombas, libera la inhibición, e incrementa la salida de Ca²⁺ de la célula (Brini y Carafoli., 2009; Edes y Krains., 1998). La PMCA opera con una alta afinidad por el Ca²⁺ y una baja

capacidad de transporte, presentando una estequiometría de 1:1 $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$; funciona como un intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ (Brini y Carafoli., 2009; Floyd R y Wray S., 2007).

Intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$

En diversos estudios se ha reportado al intercambiador NCX en una amplia variedad de células y tejidos animales y constituye uno de los mecanismos más importantes para expulsar Ca^{2+} de citoplasma al medio extracelular (DiPolo y Beauge., 2006; Blaustein MP y Leader WJ., 1999). La bidireccionalidad de este intercambiador dependerá del gradiente de Na^{+} , dicha proteína en su forma normal introduce 3 iones Na^{+} al citoplasma por cada ion Ca^{2+} que expulsa fuera de la célula, y en su forma reversa (NCXrev) introduce un ion Ca^{2+} por cada 3 iones Na^{+} que saca de la célula (Matsuda *et al.*, 1997; DiPolo y Beauge., 2006; Blaustein MP y Leader WJ., 1999).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen antecedentes que muestran el efecto relajante de DHEA, TES y 17 β -estradiol en el MLVA, sin embargo, es desconocido el papel de dichas hormonas en el tono basal del MLVA y resultan importantes explorarlos, ya que el tono basal es considerado el punto intermedio entre la relajación y la contracción. Además, los mecanismos involucrados son diferentes.

HIPÓTESIS

Debido a que la DHEA, TES y 17 β -estradiol tienen un efecto broncodilatador sobre el MLVA, cuando es contracturado con diferentes agonistas, se espera que estas hormonas induzcan un efecto de relajación en el tono basal del músculo liso de las vías aéreas de cobayo.

OBJETIVOS

General

Determinar el efecto de la, DHEA, TES y 17 β -estradiol, en el tono basal del músculo liso de las vías aéreas de cobayo.

Particulares

1. Evaluar el efecto de la DHEA, TES y 17 β -estradiol (10 μ M, 32 μ M, 100 μ M y 178 μ M) en el tono basal del MLVA de cobayos.
2. Comparar el efecto relajante de cada una de las concentraciones de cada hormona, entre cada una de ellas (DHEA, TES y 17 β -estradiol).
3. Realizar una curva concentración respuesta del salbutamol durante el tono basal. (sustancia de referencia en la relajación).
4. Comparar el porcentaje máximo de relajación de DHEA, TES y 17- β estradiol, con el Salbutamol.
5. Determinar que hormona ejerce el mayor efecto de relajación.

METODOLOGÍA

El manejo de los animales y su sacrificio se realizará de acuerdo a la norma: NOM-062-Z00-1999. Los desechos de los diversos experimentos se manejarán conforme a las normas NOM-085-SEMARNAT-2011 y la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental- Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos- Clasificación y especificaciones de manejo. Para el presente trabajo se utilizaron cobayos machos de la cepa Hartley, con un peso de 350 a 450 g, provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Los cobayos fueron sacrificados mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (35 mg/Kg i.p.), desangrados e inmediatamente después se extrajo la tráquea y se colocó en una caja Petri con solución de Krebs Ringer con la siguiente composición (mM): NaHCO_3 (25), NaCl (118), KCl (4.77), KH_2PO_4 (1.20), MgSO_4 (1.20), CaCl_2 (2.5) y Glucosa (11). La solución se mantuvo a temperatura de 37°C y burbujeada constantemente con una mezcla gaseosa de 5% de CO_2 y 95% de O_2 para mantener un pH de 7.4. Posteriormente, se eliminó el exceso de tejido conjuntivo adyacente bajo microscopio estereoscópico e inmediatamente después la tráquea se seccionó en ocho segmentos, cada uno fue destinado a diferentes condiciones experimentales.

Cada segmento fue colocado en una cámara individual de órganos aislados, la cual en la parte posterior tiene un transductor de tensión isométrica (Modelo FT03; Grass instruments, West Warwick, RI, USA) conectado a un amplificador de señal CyberAmp 380, Axon instruments, Foster City, CA, USA) y que a su vez estaba conectado a un convertidor análogo digital (Digidata 1440A; Axon). y cada cámara contenía 5 ml de solución de Krebs Ringer con burbujeo constante y a temperatura de 37°C . La tensión generada fue registrada, almacenada y analizada en una computadora mediante el programa (AxoScope versión 10.2; Axon). Las preparaciones se mantuvieron en reposo por 45 minutos antes de iniciar los diferentes protocolos experimentales.

Con el propósito de normalizar las respuestas de los tejidos, estas se estimularon tres veces con KCl (60 mM) durante 20 minutos o hasta alcanzar la respuesta

máxima de contracción, posteriormente se lavaron con solución de Krebs Ringer y cuando regresaron a su basal se dejaron en reposo por 30 minutos.

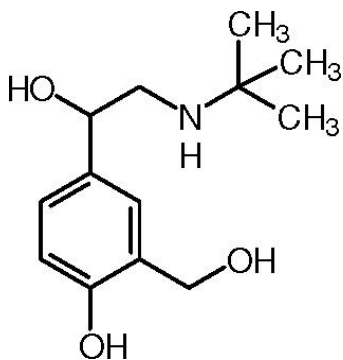
Una vez estable el tono basal de los tejidos se adicionó a concentraciones únicas DHEA (10 μ M, 32 μ M, 100 μ M y 178 μ M) para cada cámara con el objetivo de inducir una relajación del tono basal hasta que se llegó a su máxima relajación, esto tardó aproximadamente 20 minutos, posteriormente se detuvo el experimento y se desmontaron los tejidos. Se realizó el mismo protocolo con testosterona (10 μ M, 32 μ M, 100 μ M y 178 μ M) y 17 β -estradiol (10 μ M, 32 μ M, 100 μ M y 178 μ M).

Con la finalidad de tener una sustancia con la cual se pueda comparar el efecto de cada hormona, se utilizó salbutamol, ya que es conocido que es un potente broncodilatador. Se siguió el mismo protocolo experimental que con las hormonas, a concentraciones de 10 nM, 32 nM, 100 nM y 320 nM.

Fármacos.

Todas las sustancias utilizadas fueron adquiridas en Sigma (Chemical Co., St Louis MO., EUA): Dehidroepiandrosterona (3 β -hidroxi-5-androsten-17-ona), testosterona (17 β -hidroxi-5 α -androstan-3-ona), 17 β -estradiol (1, 3, 5-estratrien-3,17 β -diol) y salbutamol. Todas las hormonas y se disolvieron en etanol y el salbutamol en agua. Cada concentración fue aplicada en un volumen final de 0.1% v/v en 5 ml de solución de Krebs Ringer.

Salbutamol.



Agonista selectivo de los receptores adrenérgico β_2 del músculo liso bronquial, broncodilatador con poca o ninguna acción sobre receptores adrenérgicos β_1 del músculo cardíaco, utilizado para prevención y tratamiento sintomático del broncoespasmo en asma bronquial y en otros procesos asociados a obstrucción reversible de vías respiratorias (www.vademecum.es).

Análisis estadístico

El efecto producido por las hormonas y el salbutamol en el tono basal es presentado como porcentaje (%) de relajación del tono basal con respecto a 1 g de tensión que representa el 100 %. Los datos presentados en los gráficos de barras representan la media \pm ESM. Se realizó una comparación de cada porcentaje de relajación de todas las concentraciones de las hormonas y del porcentaje máximo de relajación de dichas hormonas con el porcentaje máximo de relajación del salbutamol. El análisis se hizo mediante una prueba de análisis de varianza de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples Tukey-Kramer. La significancia estadística se fijó a una $p < 0.05$. Se realizaron gráficos de barras de promedio \pm ESM. En todos los experimentos la $n \geq 4$ corresponde a diferentes cobayos machos.

RESULTADOS

1. La DHEA produce disminución del tono basal en el MLVA de cobayo.

Después de la tercera administración de KCl el tejido se lavó con Krebs regresando a su tono basal original, pasados 30 minutos se estimulo al tejido con dosis únicas de DHEA (10 μ M, 32 μ M, 100 μ M y 178 μ M), produciendo la disminución del tono basal dependiente de la concentración (14.76 \pm 3.48 %, 24.52 \pm 4.27 %, 41.758 \pm 4.10 % y 50.74 \pm 2.87 % respectivamente), es decir a mayor concentración mayor es la relajación observada en estos tejidos, estos porcentajes se obtuvieron con respecto al gramo de tensión al cual se encontraban los tejidos el cual representa el 100% del tono basal del MLVA.

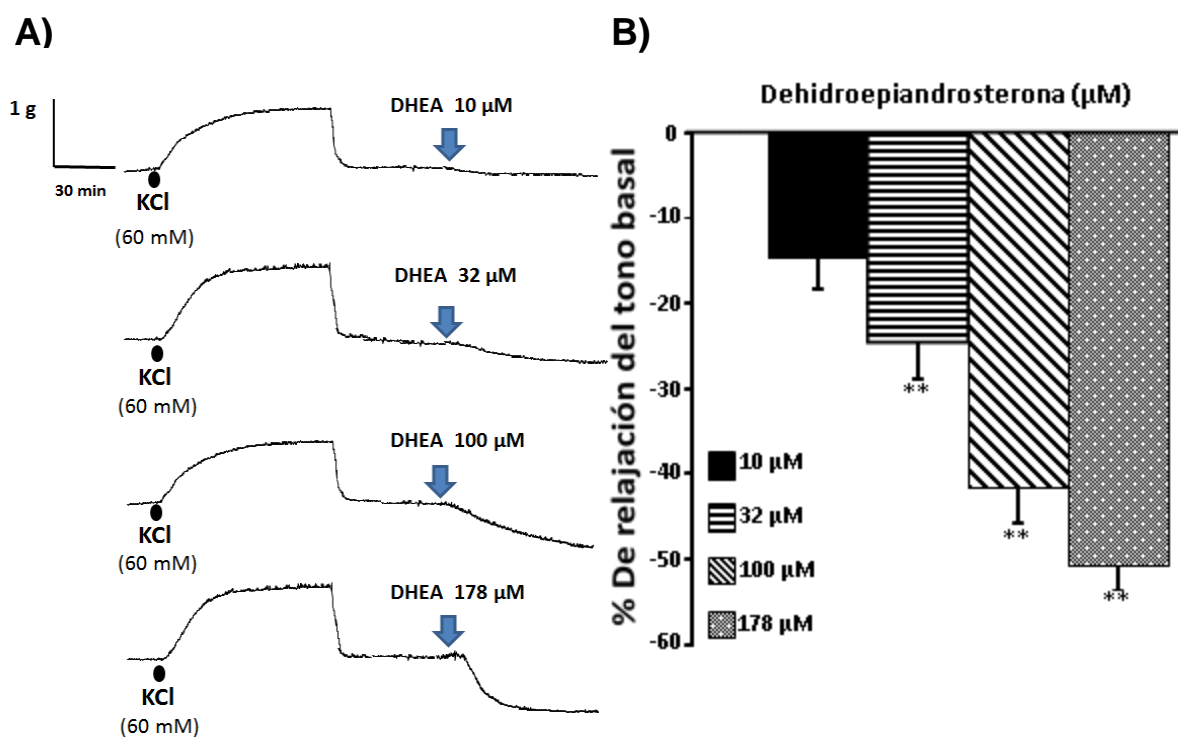


Figura 5. A) Registro original que muestra el efecto de la DHEA (10, 32, 100 y 178 μ M) sobre el tono basal del MLVA de cobayo. B) Porcentaje de relajación con respecto a 1 g de tensión (100 %) inducido por la DHEA en el tono basal del MLVA. Cada barra corresponde a los promedios del porcentaje de relajación de cada concentración \pm ESM. Al igual que en los registros originales se observa como los porcentajes de relajación (14.76 \pm 3.48%, 24.52 \pm 4.27%, 41.758 \pm 4.10% y 50.74 \pm 2.87%) son dependientes de la concentración.

2. Efecto de la TES en el tono basal del MLVA de cobayo.

La administración de TES en dosis únicas (10 μM , 32 μM , 100 μM y 178 μM). Al igual que se observó con la DHEA la TES produce una disminución del tono basal dependiente de la concentración, pero en menor proporción (10 μM = 7.26 ± 1.81 , 32 μM = 27.54 ± 4.84 , 100 μM = 35.95 ± 4.39 y 178 μM = 41.20 ± 4.48).

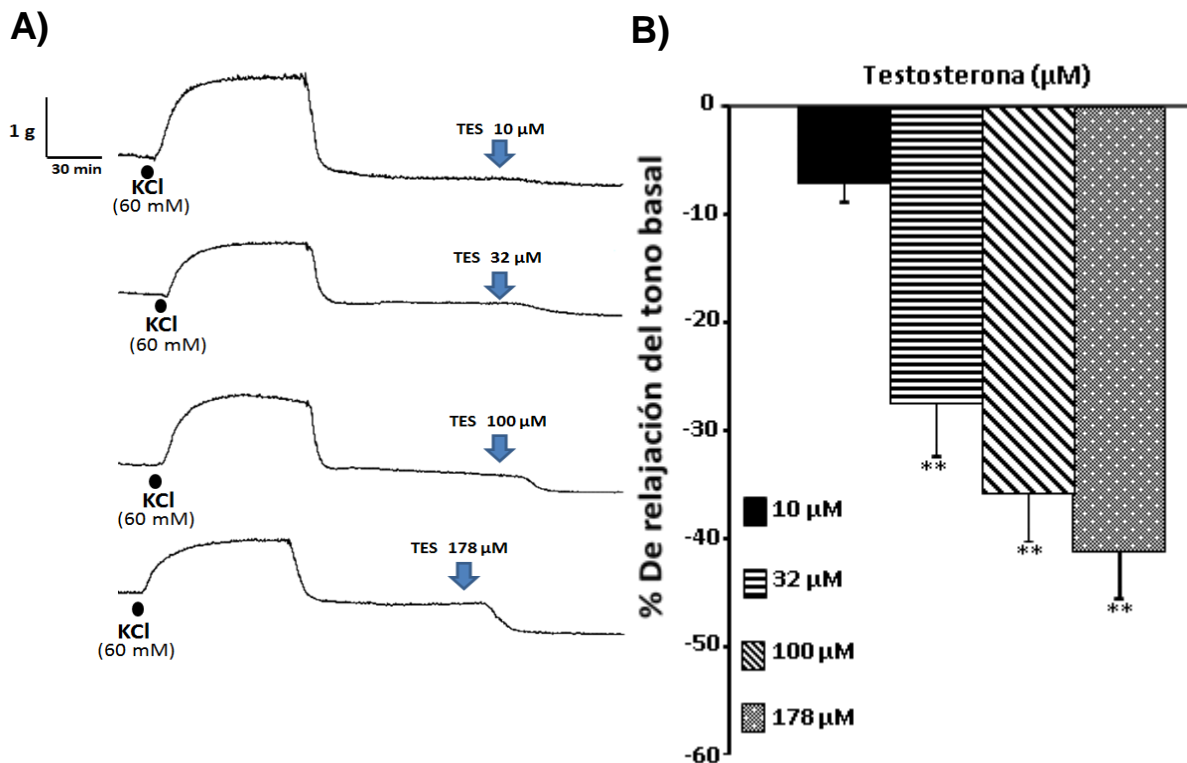


Figura 6. A) Registro original que muestra el efecto de la TES (10, 32, 100 y 178 μM) sobre el tono basal del MLVA de cobayo. B) Porcentaje de relajación con respecto a 1 g de tensión (100 %) ejercido por la TES en el tono basal del MLVA. Cada barra corresponde a los promedios del porcentaje de relajación de cada concentración \pm ESM. Se observa como el porcentaje de relajación es dependiente de la concentración y al comparar con la DHEA se observa un porcentaje de relajación muy similar por lo que no hay diferencia significativa entre los efectos de ambas hormonas.

3. El 17β-estradiol no produce disminución significativa del tono basal del MLVA de cobayo.

Se siguió el mismo protocolo experimental que con DHEA y TES, a diferencia que con las dos hormonas anteriores el estradiol produjo una disminución muy pequeña del tono basal (10 μM = 9.06 ± 5.35 %, 32 μM = 9.15 ± 2.21 %, 100 μM = 13.50 ± 4.15 %) y con la mayor concentración de estradiol (178 μM) se observó un ligero aumento del tono basal.

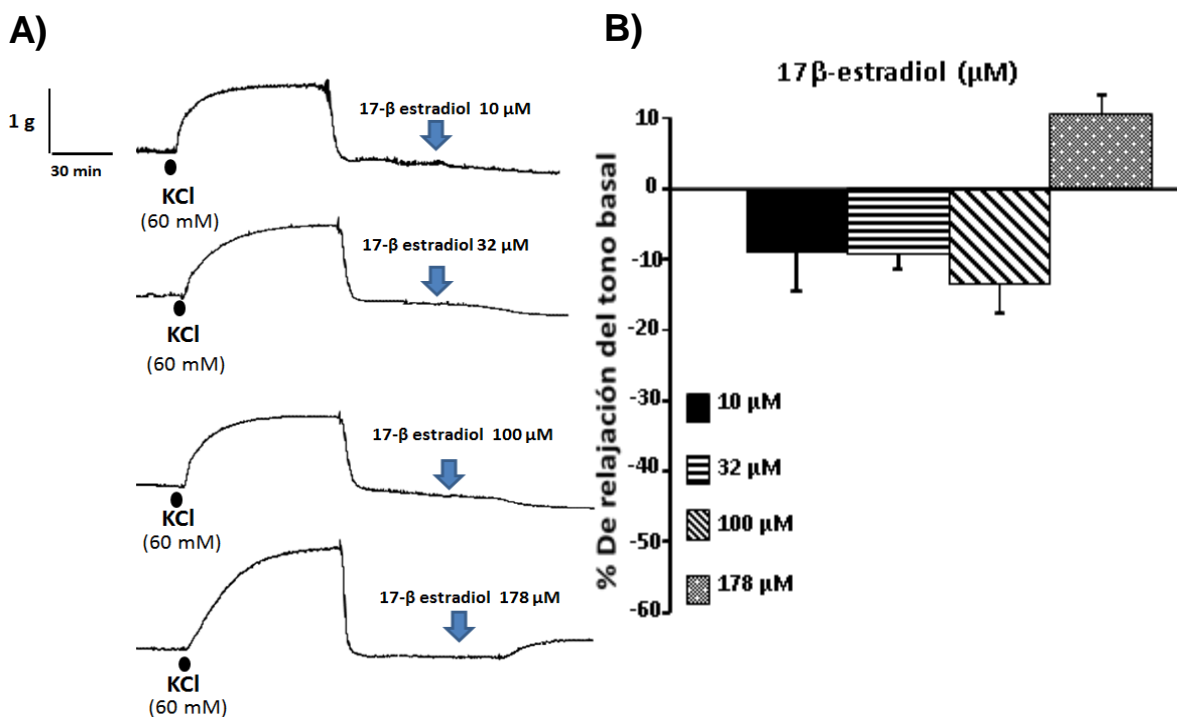


Figura 7. A) Registro original que muestra el efecto del 17-β estradiol (10, 32, 100 y 178 μM) sobre el tono basal del MLVA de cobayo. B) Porcentaje de relajación con respecto a 1 g de tensión (100%) ejercido por E₂ en el tono basal del MLVA de cobayo. Cada barra corresponde a los promedios del porcentaje de relajación de cada concentración ± ESM.

4. El efecto del salbutamol en el tono basal del MLVA de cobayo es similar al efecto producido por DHEA y TES.

Bajo el mismo protocolo experimental que con las hormonas sexuales, se observó que la estimulación con salbutamol induce un efecto relajante, el cual es dependiente de la concentración (10 nM y 32 nM, la relajación máxima se observó con la concentración de 32 nM ($44.68 \pm 6.89\%$). Por otro lado, la estimulación con 100 nM y 320 nM (100 nM= $35.97 \pm 4.17\%$, 320 nM= $22.83 \pm 6.30\%$) muestran una reducción en la relajación del tono basal cuando la comparamos con 32 nM. Esta disminución de la respuesta con concentraciones de 100 nM y 320 nM probablemente sea debido a una desensibilización de los receptores adrenérgicos β_2 . La relajación promovida por el salbutamol es similar a lo observado con DHEA y TES, pero con la diferencia que el efecto del salbutamol es más potente que el inducido por las hormonas, ya que su efecto se observó a concentraciones mil veces menores.

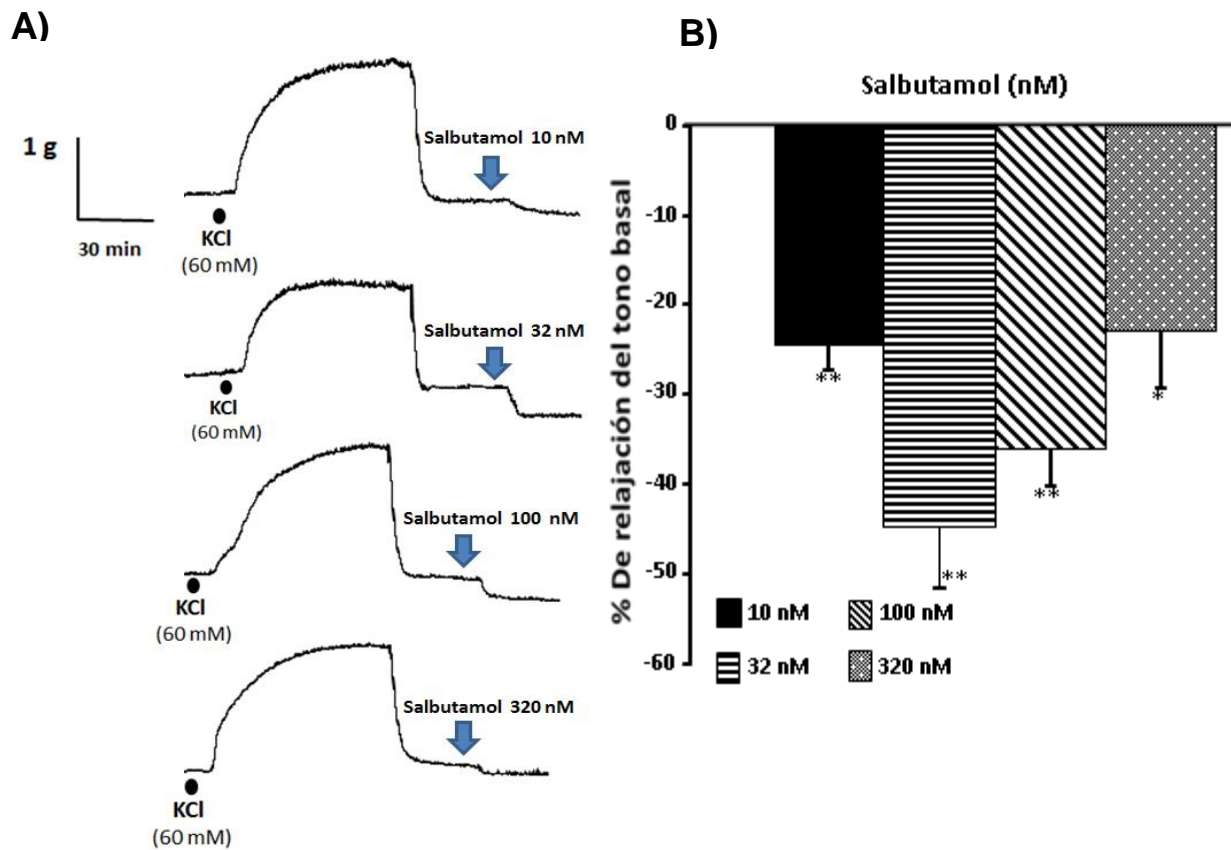


Figura 8. A) Registro original que muestra el efecto del Salbutamol (10, 32, 100 y 320 nM) sobre el tono basal del MLVA de cobayo. B) Porcentaje de relajación con respecto a 1 g de tensión (100 %) ejercido por el Salbutamol en el tono basal del MLVA de cobayo. Cada barra corresponde a los promedios del porcentaje de relajación de cada concentración \pm ESM.

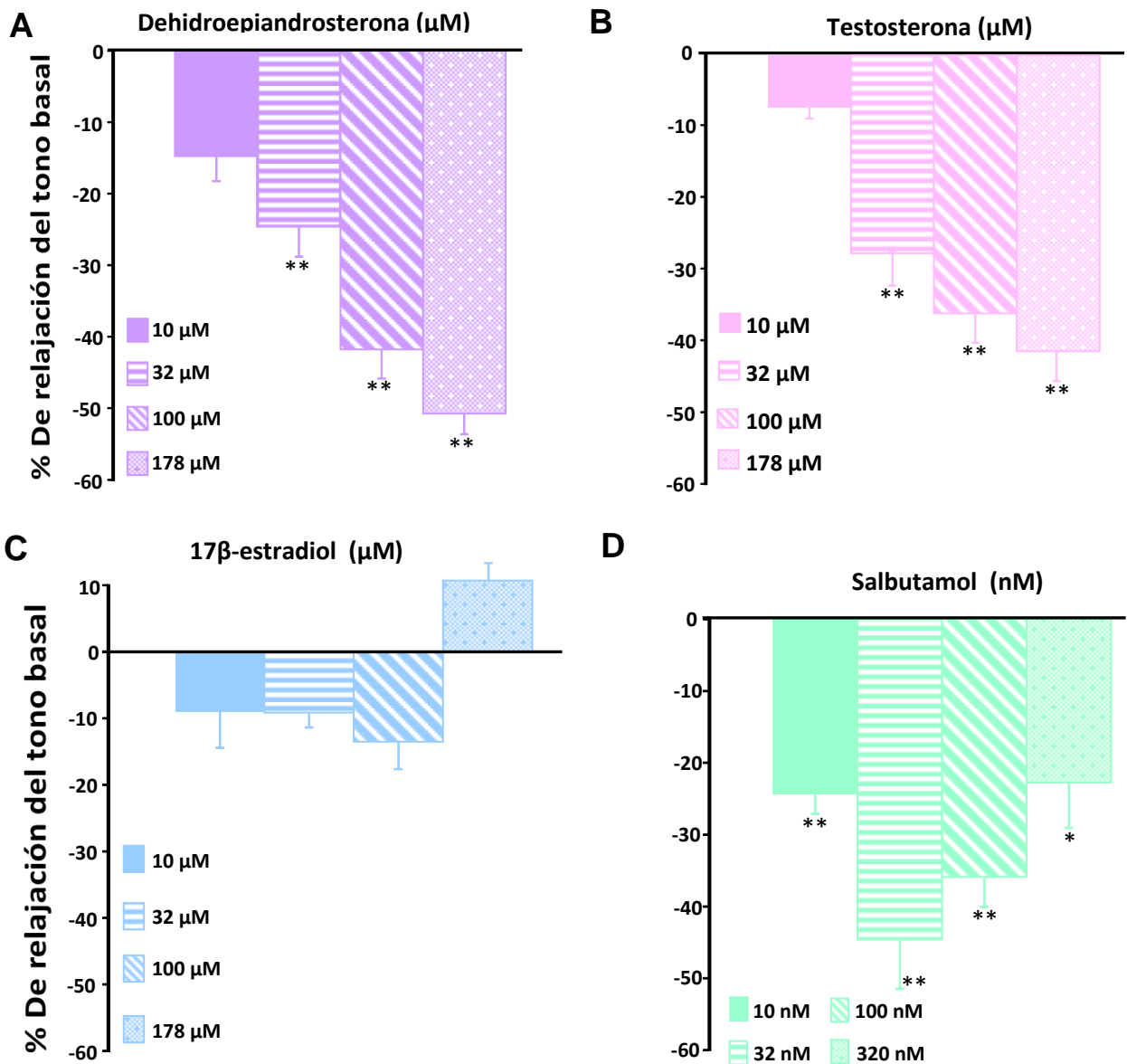


Figura 9. Comparación de los porcentajes de relajación de DHEA, TES ,17β-estradiol y salbutamol. La DHEA (A) y la TES (B) provocan una relajación dependiente de la concentración en el tono basal del MLVA de cobayo observándose su respuesta máxima a una concentración de 178 μM. Un efecto mínimo puede observarse con E2 (C) el cual no es significativo. DHEA y TES muestran efectos de relajación en el tono basal similares sin diferencia significativa entre ellos ($P > 0.05$), pero estadísticamente diferente a E2 ($P < 0.001$). Comparando las respuestas máximas de DHEA y TES con la respuesta máxima de la sustancia de referencia, salbutamol 32nM (D), sus porcentajes de relajación nuevamente son similares ($P > 0.05$). Al igual que con TES y DHEA, el salbutamol en comparación con el E2 muestra una diferencia significativa ($P < 0.001$). Se realizó un análisis de varianza de una sola vía mediante una prueba de Tukey-Kramer. Cada barra representa el promedio del porcentaje de relajación \pm ESM.

Tabla 3. Promedio de los porcentajes de relajación de DHEA, 17- β estradiol, TES y salbutamol con sus respectivos errores estándares de la media (ESM), desviaciones estándar (DE) y número de tejidos utilizados (n).

DHEA (% de relajación)							
10 μ M		32 μ M		100 μ M		178 μ M	
promedio	-14.76 \pm 3.48	promedio	-24.52 \pm 4.27	promedio	-41.758 \pm 4.10	promedio	-50.74 \pm 2.87
DE	13.48866 64	DE	16.529405 8	DE	15.87422355	DE	8.6260312 2
n	15	n	15	n	15	n	9
17 β -estradiol (% de relajación)							
10 μ M		32 μ M		100 μ M		178 μ M	
promedio	-9.06 \pm 5.35	promedio	-9.15 \pm 2.21	promedio	-13.50 \pm 4.15	promedio	10.74 \pm 2.80
DE	16.03722 9	DE	7.0023088 7	DE	13.11912713	DE	6.2527983 4
n	9	n	10	n	10	n	5
TES (% de relajación)							
10 μ M		32 μ M		100 μ M		178 μ M	
promedio	-7.26 \pm 1.81	promedio	-27.54 \pm 4.84	promedio	-35.95 \pm 4.39	promedio	-41.20 \pm 4.48
DE	5.442156 43	DE	14.506927 2	DE	13.8977581	DE	12.674992 8
n	9	n	9	n	10	n	8
Salbutamol (% de relajación)							
10 nM		32 nM		100 nM		320 nM	
promedio	-24.47 \pm 2.71	promedio	-44.68 \pm 6.89	promedio	-35.97 \pm 4.17	promedio	-22.83 \pm 6.30
DE	6.643446 9	DE	16.882566 5	DE	10.22296173	DE	12.612823 6
n	6	n	6	n	6	n	4

DISCUSIÓN

Los resultados de la presente tesis muestran que la DHEA y la TES tienen la capacidad de inducir un efecto de relajación en el tono basal del MLVA de cobayo, el cual es dependiente de la concentración. En cambio con el 17β -estradiol a diferencia de la DHEA y TES no se observa este efecto de relajación significativo.

Estudios previos nos sugieren un papel importante de los efectos biológicos de las hormonas sexuales como relajantes del MLVA mediante efectos genómicos y no genómicos por ejemplo la TES induce efectos relajantes sobre las contracciones inducidas por Ach y CCh en tráquea aislada de conejo (Koulomenta *et al.*, 2006) y sobre contracciones inducidas por CCh y KCl en tiras aisladas de MLVA de bovino (Bordallo *et al.*, 2008), así mismo, se ha reportado que las hormonas sexuales femeninas como el 17β -estradiol previenen la contracción provocada por CCh o histamina mediante un mecanismo de acción tipo no genómico (Perusquía *et al.*, 1997).

En este trabajo se reporta por primera vez el efecto de relajación de diferentes hormonas sexuales en el tono basal del MLVA de cobayo mediante el efecto no genómico debido a la rapidez con la que se observaron los efectos, cabe mencionar que el tono basal es considerado como el punto intermedio entre la relajación y la contracción. En la figura 5 podemos observar que el tono basal es relajado significativamente por la DHEA en todas sus concentraciones probadas (10, 32, 100 y 178 μ M, n=9-15) y en la figura 6 se observa que la TES solo en las últimas tres concentraciones probadas (32, 100 y 178 μ M, n=5-10), previamente efectos relajantes similares se habían observado en algunos estudios, en uno de ellos se muestra el efecto relajante de la DHEA en el MLVA de cobayo cuando este fue contracturado por diferentes sustancias (Espinoza *et al.*, 2013), en dicho estudio se observó que esta hormona induce una relajación más allá del tono basal y recientemente en otro estudio Perusquía y col. En 2015 demostraron que la TES inducía un efecto de relajación cuando el tejido era contracturado con CCh., ya que la TES bloquea a los VDCC-L (canales de calcio dependientes de voltaje tipo L) y a los SOC (canales de calcio operados por depósito), así como

induce endógenamente la producción de PGE₂. En este estudio se observó que la intensidad de la relajación de la TES era mayor al tono basal; sin embargo ninguno de estos estudios ni ningún otro se ha centrado a evaluar el efecto de las hormonas sexuales específicamente en el tono basal.

Como se puede observar en la tabla 1, los porcentajes de relajación de DHEA y TES a concentraciones de 178 μM (51 ± 3% y 41 ± 5% respectivamente) son semejantes y hay 10 % de diferencia no significativa lo cual nos sugiere que probablemente estas hormonas estén ejerciendo su efecto siguiendo el mismo mecanismo, el cual es desconocido, pero podrían estar actuando sobre alguno o varios de los principales mecanismos que mantienen el tono basal los cuales son: ATPasa del Retículo Sarcoplásmico, la ATPasa de la Membrana Plasmática, el intercambiador Na⁺/Ca²⁺, los canales de Ca²⁺ y los canales de calcio operados por depósito (SOC).

Por otro lado, con el E₂ se observó que induce un pequeño pero no significativo efecto de relajación sobre el tono basal del MLVA de cobayo (32 y 100 μM, n=5-10), estos resultados podrían relacionarse a los efectos de los estrógenos observados por Troisi y col en 1995 en un estudio epidemiológico de más de 100,000 enfermeras de los EE.UU, donde reportó que el uso largo o la terapia de reemplazo con estradiol aumentan los riesgos de sufrir asma. Otro ejemplo sería el de Lieberman y col., en 1995 encontró un pequeño pero significativo empeoramiento del flujo espiratorio máximo entre las mujeres con asma después de comenzar la terapia de reemplazo con estradiol. Recientemente, en nuestro laboratorio observamos que el estradiol produce hiperreactividad del músculo liso traqueal de cobayo a la histamina en concentraciones de 1 y 10 μM, así como a la 5-HT (5-hidroxitriptamina) a concentraciones de 320 nM. No sabemos porque el E₂ no tuvo el mismo efecto relajante que la DHEA y la TES y en la bibliografía no hay trabajos precedentes del efecto del E₂ sobre el tono basal, por lo que solo podemos afirmar que no tiene el mismo efecto que la DHEA y la TES y para fines de la presente tesis no se considera que tiene un efecto relajante del tono basal.

Se realizó la comparación del efecto de las hormonas sexuales con un broncodilatador conocido, el salbutamol, el cual es un agonista adrenérgico β_2 . Se observó que, los porcentajes de relajación son semejantes a la DHEA y TES ($45\pm 7\%$, $51\pm 3\%$ y $41\pm 5\%$ respectivamente), y no se encontró diferencia significativa entre ellos, sin embargo las concentraciones del salbutamol fueron mil veces menores, esto quiere decir que su efecto es más potente pero igual de eficaz que DHEA y TES. Es prudente mencionar que estos agonistas adrenérgicos β como el salbutamol poseen efectos secundarios (Giubergia., 2009; Huclova *et al.*, 2003), como taquicardia; por lo que el uso prolongado de estos agonistas adrenérgicos β_2 aún sigue siendo debatido (Arboe y Ulrik., 2013; Hizawa., 2009) y hace necesario que se busquen nuevas alternativas terapéuticas. Además de que en ocasiones se complementa su uso con corticosteroides, por su potente acción antiinflamatoria (Edmonds *et al.*, 2012; Barnes y Adcock., 2003).

Es por esto que, aunque DHEA y TES mostraron menor potencia que el salbutamol, sus acciones relajantes sobre el tono basal son igual de eficaces y podrían ser consideradas como una alternativa para el tratamiento de las exacerbaciones asmáticas, sobre todo la DHEA ya que no tiene efectos hormonales genómicos como la TES, podría implicar cierto riesgo debido a que esta hormona es la precursora tanto de TES como de E_2 , con respecto a esto existe previamente un estudio en el cual se administró DHEA-3-sulfato en forma nebulizada como antiinflamatorio, el cual es un metabolito de la DHEA, y se observó que ayudó a controlar el asma en pacientes masculinos y femeninos sin modificar los niveles plasmáticos de las hormonas sexuales (Wenzel *et al.*, 2010). Por lo que creemos que realizando más estudios esta hormona podría ser un broncodilatador eficaz en enfermedades como el asma.

En conclusión: DHEA y TES tienen un efecto relajante en el tono basal del MLVA de cobayos dependiente de la concentración observándose el mayor porcentaje de relajación a la concentración de 178 μM en ambos casos, mientras que el E_2 ejerce un mínimo pero no significativo efecto relajante a concentraciones de 32 μM y 100 μM .

Al no encontrarse diferencia significativa entre sus porcentajes de relajación, tanto DHEA como TES son igual de eficaces y menos potentes que el salbutamol en el tono basal del MLVA de cobayo.

Perspectivas:

Explorar mediante la técnica de microfluorometría los mecanismos mediante los cuales DHEA y TES están llevando a cabo su efecto de relajación en el tono basal del MLVA de cobayo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aleph Prieto G *et al.* ¿Cómo actúan las hormonas esteroides? *Educación Química*. 2002; 14(4): 196-201.
2. Amado J.A. y Flórez J. Hormonas sexuales: estrógenos, gestágenos, andrógenos, andrógenos y anticonceptivos hormonales.
3. Barnes PJ y Adcock IM. How do corticosteroids work in asthma? *Ann Intern Med*. 2003; 139: 359-370.
4. Baulieu EE, Thomas G, Legrain S, Lahlou N, Roger M, Debuire B, Faucounau V, Girard L, Hervy MP, Latour F, Leaud MC, Mokrane A, Pitti-Ferrandi H, Trivalle C, de Lacharrière O, Nouveau S, Rakoto-Arison B, Souberbielle JC, Raison J, Le Bouc Y, Raynaud A, Girerd X & Forette F. Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: Contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue. *PNAS*. 2000; 97: 4279-4284.
5. Bellia V, Augugliaro G. Asthma and menopause. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2007; 67: 125–127.
6. Borawski D, Bluth MH. Reproductive function and pregnancy. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 22nd ed., Elsevier Saunders; Philadelphia. 2011:chap 25.
7. Brini M, Carafoli E. Calcium pumps in health and disease. *Physiol. Rev*. 2009; 89:1341-78.
8. Castillo S, Gismondi MI, Klajn D, Mas E, Tzall K. *Fisiología Humana. Un enfoque integrado*. Editorial Medica Panamericana. 4ª edición. Argentina. 2009; 219-221.
9. Chandler MH, Schuldheisz S, Phillips BA, Muse KN. Premenstrual asthma: the effect of estrogen on symptoms, pulmonary function, and β_2 -receptors. *Pharmacotherapy*. 1997; 17: 224–234.

10. Chhabra SK. Premenstrual asthma. *Indian J Chest Dis Allied Sci.* 2005; 47: 109–116.
11. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell.* 1995;80:259-268.
12. Cobar L, Cruz-Valderrama JE, Montañó LM, Flores Soto E. Importancia del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ en la regulación de Ca²⁺ del músculo liso de las vías aéreas. *Neumol Cir Torax* 2010; 1:39-45.
13. DiPolo R, Beaugé L. Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions. *Physiol Rev* 2006; 86: 155-203.
14. Diver MJ, Imtiaz KE, Ahmad AM, Vora JP y Fraser WD. Diurnal rhythms of serum total, free and bioavailable testosterone and SHGB in middle-aged men compared with those in Young men. *Clin Endocrinol Oxf.* 2003; 58: 710-717.
15. Ebeling P, Koivisto V.A. Non-esterified fatty acids regulate lipid and glucose oxidation and glycogen synthesis in healthy man. *Diabetologia.* 1994; 37: 202-209
16. Edes I, Kranias EG. Ca²⁺-ATPases/pumps. In: Cell Physiology Source Book: Section II Transport physiology, pumps and exchangers. 2nd ed. *New York: Academic press;* 1998; 255-236.
17. Edmonds EL, Milan SJ, Camargo CA, Jr., Pollack CV y Rowe BH. Early use of inhaled corticosteroids in the emergency department treatment of acute asthma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012; 12, CD002308.
18. Espinoza J, Montañó LM, Perusquía M, Nongenomic bronchodilating action elicited by dehydroepiandrosterone (DHEA) in a guinea pig asthma model. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2013; 138: 174-182.
19. Giubergia V. Long-acting beta2-agonist bronchodilators safety for asthma treatment. *Arch Argent Pediatr.* 2009; 107: 291-293.

20. Hartmann S, Larcon M, Steinhart H. Natural occurrence of steroid hormones in food. *Food Chemistry*. 1998; 62: 7-20.
21. Hanley SP. Asthma variation with menstruation. *Br J Dis Chest* 1981; 75: 306–308.
22. Hellings PW, Vandekerckhove P, Claeys R, Billen J, Kasran A, Ceuppens JL. Progesterone increases airway eosinophilia and hyperresponsiveness in a murine model of allergic asthma. *Clin Exp Allergy*. 2003; 33: 1457–1463.
23. Huclova J, Satinsky D, Sklenarova H y Karlicek R. Determination of salbutamol using on-line solid-phase extraction and sequential injection analysis. Comparison of chemiluminescence and fluorescence detection. *Anal Bioanal Chem*. 2003; 376: 448-453.
24. Kellner J, Tantzsch J, Oelmez H, Edelmann M, Fischer R, Huber RM, Bergner A. Mechanisms altering airway smooth muscle cell Ca^{2+} homeostasis in two asthma models. *Respiration*. 2008; 76: 205–215.
25. Matsuda T, Takuma K, Baba A. Na^{+}/Ca^{2+} exchanger: physiology and pharmacology. *Jpn J Pharmacol*. 1997; 74: 1-20.
26. Nemere I y Farach-Carson M. Membrane receptors for steroid hormones: a case for specific cell surface binding sites for vitamin D metabolites and estrogens. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 248: 443-9.
27. Olsen NJ y Kovacs WJ. Case report: testosterone treatment of systemic lupus erythematosus in a patient with Klinefelter's syndrome. *Am J Med Sci*. 1995; 310: 158-160.
28. Orrego A, Vélez H, Rojas W, Borrero J, Restrepo J. Fundamentos de medicina. Endocrinología. 6ª edición. Fondo editorial CIB. Colombia 2004.
29. Ostatnikova D, Pastor K, Putz Z, Dohnanyiova M, Mat'aseje A y Hampl R. Salivary testosterone levels in preadolescent children. *BMC Pediatr*. 2002; 2: 5.

30. Ottinger, Mary Ann. Male reproduction: Testosterone, gonadotropins, and aging, in: Mobbs, C.V., and Hof, P.R. (eds). *Functional Endocrinology of Aging*. Interdiscipl Top Gerontol, Basel, Karger, 1998, Vol. 29, 105-126.
31. Periasamy M y Kalyanasundaram A. SERCA Pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve*. 2007; 35: 430-442.
32. Perusquía M, Flores-Soto E, Sommer B, Campuzano-González E, Martínez-Villa I, Martínez-Banderas AI, Montaña LM. Testosterone-induced relaxation involves L-type and store-operated Ca²⁺ channels blockade, and PGE 2 in guinea pig airway smooth muscle. *Eur J Physiol*. 2014.
33. Perusquia M, Hernandez R, Montaña LM, Villalon CM, Campos MG. Inhibitory effect of sex steroids on guinea-pig airway smooth muscle contractions. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*. 1997; 118: 5–10.
34. Perusquia M, Stallone J. Do androgens play a beneficial role in the regulation of vascular tone? Nongenomic vascular effects of testosterone metabolites. *Am J Physiol-Heart and Circulatory Physiol*. 2010; 298:1301-1307.
35. Poletti A, Corscarella A, Negri-Cesi P, Colciago A, Celotti F y Martini L. 5 alpha-reductase isozymes in the central nervous system. *Steroids*. 1998; 63, 246-251.
36. Pozzi P, Bendotti C, Simeoni S, Piccionni F, Guerini V, Marron TU, Martini L y Poletti A. Androgen 5-alpha-reductase type 2 is highly expressed and active in rat spinal cord motor neurons. *J Neuroendocrinol*, 2003; 15, 882-887.
37. Rainey WE, Carr BR, Sasano H, Suzuki T y Mason JI. Dissecting human adrenal androgen production. *Trends Endocrinol Metab*. 2002; 13: 234-239.

38. Reyna-Neyra A, Camacho-Arroyo I, Ferrera P and Arias C. Estradiol and progesterone modify microtubule associated protein 2 content in the rat hippocampus. *Brain Research Bulletin*. 2002; 58(6): 607-612.
39. Romieu, P, Martin-Fardon R, Bowen W.D, and Maurice T. Sigma 1 Receptor-Related Neuroactive Steroids Modulate Cocaine-Induced Reward. *The Journal of neuroscience*. 2003; 23(9): 3572.
40. Salom M y Jabaloyas Martínez JM. Síndrome de déficit de testosterona y disfunción eréctil. *Arch. Esp. Urol*. 2010; 63(8): 663-670.
41. Strehler E y Zacharias D. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev*. 2001; 81:21-50.
42. Teijón Rivera J.M, Garrido Pertierra A y Blanco Gaitán D. Fundamentos de Bioquímica Metabólica. 2ª edición. Ed. Tebar. Madrid. 2006; 137-140.
43. Traish AM, Saad F, Feeley RJ y Guay A. (2009a). The dark side of testosterone deficiency: I. Metabolic syndrome and erectile dysfunction. *J Androl*. 2009; 30:10-22.
44. Tsutsui K. Neurosteroid biosynthesis and function in the brain of domestic birds. *Front. Endocrinol*. 2011; 21.
45. Uniper EF, Daniel EE, Roberts RS, Kline PA, Hargreave FE, Newhouse MT. Effect of pregnancy on airway responsiveness and asthma severity. Relationship to serum progesterone. *Am Rev Respir Dis*. 1991;143: S78.
46. Verma MK, Miki Y y Sasano H. Sex steroid receptors in human lung diseases. *J Steroid Biochem. Mol Biol*. 2011; 127: 216-222.
47. Voet D, Voet JG and Pratt CW. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. Ed. Panamericana: España. 2007.

48. Wenzel, S.E., Robinson, C.B., Leonard, J.M., Panettieri, R.A., Jr. Nebulized dehydroepiandrosterone-3-sulfate improves asthma control in the moderate-to-severe asthma results of a 6-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Allergy Asthma Proc.* 2010; 31: 461-471.

49. <http://www.vademecum.es/principios-activos-salbutamol-r03cc02>